

法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

光ピンセットを用いた運動解析法による細菌べん毛モーターのトルク特性の評価

著者	飯島 悠太
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	60
ページ	1-2
発行年	2019-03-31
URL	http://doi.org/10.15002/00022098

光ピンセットを用いた運動解析法による 細菌べん毛モーターのトルク特性の評価

TORQUE-SPEED RELATIONSHIP OF THE BACTERIAL FLAGELLAR MOTOR
OF *VIBRIO ALGINOLYTICUS* MEASURED BY OPTICAL TRAPPING NANOMETRY

飯島 悠太

Yuta IIJIMA

指導教員 曾和義幸

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻生命機能学領域修士課程

Most motile bacteria swim by rotating their helical flagella like screws. Their rotation is driven by flagellar rotary motors embedded in the cell membrane. Studies of single flagellar motors by a bead assay or a tethered cell assay have been applied for only limited bacterial species, such as *Escherichia coli*. In this study, we developed an assay to monitor the flagellar rotation of swimming bacteria by optical trapping nanometry. We applied this method to measure the rotation of Na⁺-driven single polar flagellum of *V. alginolyticus* cells. The maximum speed of *Vibrio* motor was ~900 Hz, which is consistent with the previous report. We also estimated its torque-speed curve by changing viscosity of media. In principle, our method can be applicable for any flagellar motors of swimming bacteria.

Key Words : bacterial flagellar motor, torque, optical trap,

1. 緒言

細菌は、べん毛とよばれる細長いらせん状繊維をスクリューのように超高速回転させ、遊泳に必要な推進力を得ている。べん毛の回転を生み出すべん毛モーターは、繊維の根元の細胞膜中に存在する超分子複合体である[1]。このモーターは、繊維につながる回転子リングと、それを取り囲む複数の固定子ユニットから構成される。また、モーター回転を生み出すためのエネルギー源は、細胞膜内外の電気化学ポテンシャル差に伴って生じる共役イオンの細胞内への流入である。べん毛モーターの研究が進んでいる大腸菌などの周毛性細菌については、テザードセルアッセイやビーズアッセイがモーター回転機能解析に用いられてきた(Fig.1)。しかし、これらの回転機能計測法を適用するための条件が複数あり、実際に解析できる菌種は非常に限定される。たとえば、本研究で用いた *Vibrio alginolyticus* のような単極毛性細菌について、従来の回転計測法を用いることは困難であり、高輝度レーザー暗視野観察を利用した特殊手法や実験効率のきわめて悪いビーズアッセイを用いる必要があった[2]。

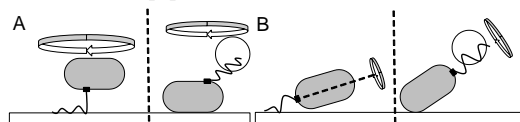


Fig.1 テザードセルアッセイとビーズアッセイを周毛性細菌(A)、と極毛性細菌(B)に適用した模式図

そこで本研究では、光ピンセットを利用することで *V. alginolyticus* の極べん毛が持つ Na⁺駆動型モーターの回転速度を計測する簡便な手法を構築し、モーターの回転トルク特性を解析した。

2. 実験手法

生細胞への影響が少ないとされる近赤外光を用いた光ピンセットを導入した光学顕微鏡を用い、遊泳細胞または抗原抗体法を用いてガラスにべん毛繊維を付着させた細胞を観察した。光ピンセットのレーザー集光点に細胞本体を捕捉し、透過したレーザーを位置検出用の光センサーに投影した[3]。モーターの回転に伴って細胞本体が微小に振動をするシグナルを検出して、モーター回転速度の計測を行った。

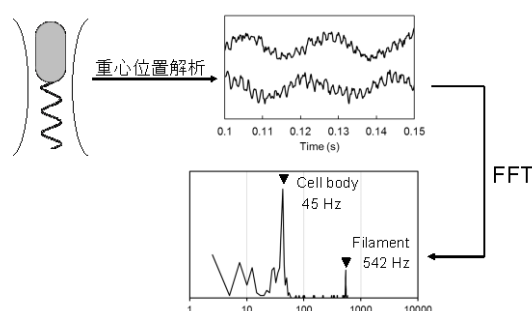


Fig.2 光ピンセットを用いた回転計測の模式図

3. 結果と考察

(1) 遊泳する細胞のモーター回転計測

光ピンセットを用いて遊泳細胞を捕捉してモーター回転速度を計測した。その結果、観察溶液中に含まれる Na^+ 濃度が上昇するにつれて、モーターの回転速度が上昇し、最大約 900 Hz に達することが確認できた(Fig. 3)。この値は、細胞遊泳速度の Na^+ 濃度依存性と同一傾向であること、過去に高輝度レーザー暗視野観察で得られた回転速度と一致することから、光ピンセットを用いてモーター回転計測を実現できていることを示している。

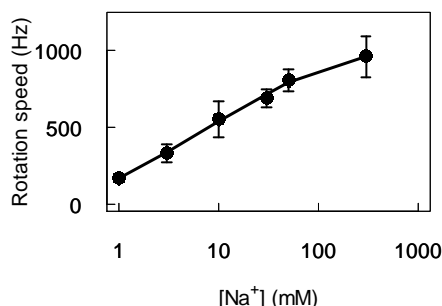


Fig.3 Na^+ 濃度がモーター回転速度に与える影響

(2) 溶液粘度がモーター回転速度に与える影響

Na^+ 濃度を 50 mM に調製した溶液に様々な濃度の Ficoll を加えることで溶液の粘度を変化させ、遊泳細胞を捕捉してモーター回転速度を計測した。その結果、モーター回転速度は粘度の上昇とともに低下していくことを確認できた。また、べん毛繊維の形状から計算した粘性抵抗係数をもとに、モーター回転トルクを算出した。低速度領域ではほぼ一定のトルクを発生するが、高速度領域ではトルクが減少する過去の結果と同様の傾向が得られた[1]。しかし、今回得られた最大トルクの値は過去の結果の 70% 程度となった。

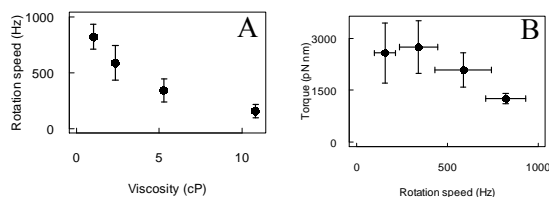


Fig.4 溶液中の粘度がモーター回転に与える影響(A)とトルク特性(B)

(3) テザードセルアッセイによるモーター回転計測

極べん毛繊維に対する抗体を用いて、べん毛をガラスに付着させると、モーターは細胞本体を回転させる。つまり、高負荷条件下で駆動するモーターの特性を知ることができる。しかし、Fig1B で示すとおり、単極毛性細菌の場合、細胞の長軸を中心に回転するため、ビデオ画像からはモーター回転速度を見積もることは難しい。そこで、べん毛のない細胞極を光ピンセットで弱く捕捉して、細胞の位置を検出したところ、Fig.5 で示すように細胞回転に伴うシグ

ナルを得ることができた。50 mM Na^+ 条件下において、モーター回転速度は平均で約 70 Hz 前後となり、さらに Ficoll を加えて溶液粘度を上昇させて、より高負荷条件におけるモーターの特性を評価したところ、モーターの最大トルクは約 3500 pNnm となった。この値は、文献[2]ともよく一致した。

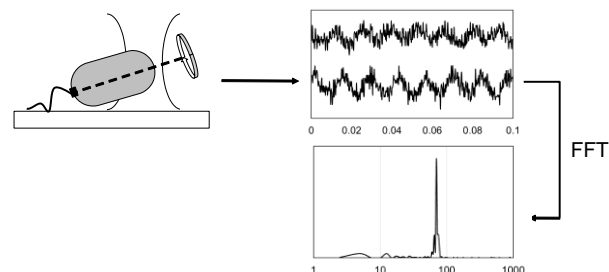


Fig.5 テザードセルアッセイによる極べん毛の解析

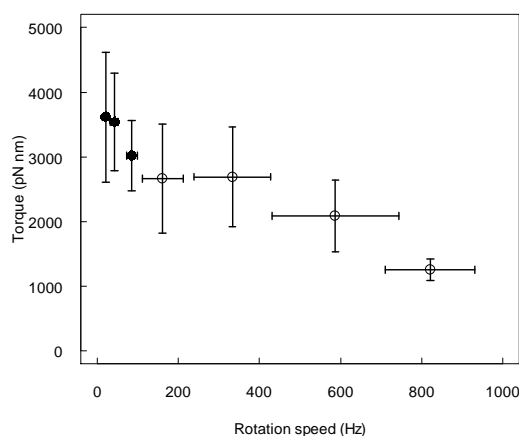


Fig.6 *V. alginolyticus* の極べん毛モーターのトルク特性

4. 結言

光ピンセットを用いたべん毛モーター回転計測系により、*V. alginolyticus* の極べん毛モーターのトルク特性を評価した。本研究で得られたすべてのデータをまとめたトルク-スピード関係を Fig. 6 に示す。本研究で確立したシステムは、遊泳細胞の捕捉またはべん毛抗体による固定で簡便にモーター回転速度・トルクを算出できるため、他の細菌にも容易に応用できると期待できる。

謝辞: 本研究で用いた観察系は、笠井大司博士(現・立教大学理学部助教)の協力の下、構築しました。また、本研究で使用した菌株・抗体の一部は、名古屋大学理学部の小嶋誠司准教授、本間道夫教授から提供を受けました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Y. Sowa & R. M. Berry (2008) *Q. Rev. Biophys.* **41**, 103-132
- 2) Y. Sowa. *et al.* (2003) *J.Mol.Biol.* **327**, 1043-1051.
- 3) A. D. Rowe *et al.* (2003) *J.Modern Optics.* **50**, 1539-1554.